

To prepare a multivalent diagnosticum, 0.1 ml of a sera mixture is taken, 0.9 ml of a 10% suspension of a formalin (a 0.5% solution of formaldehyde, 2 h) and heat (85°C, 2 h) stabilized and centrifugation washed Cowan 1 strain of *Staphylococcus aureus* is added, thoroughly stirred and adjusted with PBS to 1 ml. A campylobacteriosis diagnosticum thus prepared is controlled by performing the slide coagglutination test (CAT) in the presence of LPS or heated (100°C, 1 h) cultures of the most prevalent serotypes of *Campylobacter jejuni*, *coli*, *laridis* taken at different dilutions to determine the sensitivity of a formulation, as well as in the presence of the other enterobacteria to determine the specificity of the formulation. To perform CAT, a one drop of an each LPS dilution (10x, 10^{-1} to 10^{-4} mg/ml) is applied on a slide separated with a hectographic pencil into sectors, and a one drop of the sensitized *Staphylococcus* (the diagnosticum) is added to it. In control N 1, a one drop of a non-sensitized *Staphylococcus* (a negative control) is applied, instead of the diagnosticum, and in control N 2, *Campylobacter* LPS diluted in PBS (a positive control) is added to the diagnosticum. The drops are carefully stirred by shaking the glass for 3 to 5 min, placed in a moist chamber for 30 min. Evaluation of the test is carried out on a 4+ scale, a *Staphylococcus* agglutination value of 2+ being considered positive.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) RU (11) 2 086 984 (12) C1
(51) Int. Cl. 6 G 01 N 33/531, 33/53

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 95108336/14, 22.05.1996

(46) Date of publication: 10.08.1997

(71) Applicant:

Belaja Julije Aleksandrovna,
Belaja Olga Fedorovna, Bystrova Svetlana
Mikhailovna, Petrukhin Vladimir
Grigorievich, Prokofeva Elena
Mikhailovna

(72) Inventor: Belaja Julije Aleksandrovna,
Belaja Olga Fedorovna, Bystrova Svetlana
Mikhailovna, Petrukhin Vladimir
Grigorievich, Prokofeva Elena
Mikhailovna

(73) Proprietor:

Belaja Julije Aleksandrovna,
Belaja Olga Fedorovna,
Bystrova Svetlana Mikhailovna,
Petrukhin Vladimir Grigorievich,
Prokofeva Elena Mikhailovna

(54) METHOD OF PREPARING DIAGNOSTICUM FOR DETECTION OF CAMPYLOBACTER THERMOSTABLE ANTIGENS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, veterinary
microbiology, immunology. SUBSTANCE:
method involves preparing sera at rabbit
immunization with campylobacter cultures
killed with acetone and heating in order to
destroy thermostable antigens.
Campylobacters were selected from the most
occurring serotypes in pathology and showing
maximal set of thermostable antigens. Sera

obtained from different animals were mixed,
sensitized with cells *Staphylococcus*
aureus Cowan, washed off, resuspended and
preserved. Method is used for
express-diagnosis campylobacteriosis in
human and animals, detection of
campylobacters in foodstuffs and
environment objects. EFFECT: improved method
of preparing. 3 cl, 3 tbl

RU 2 086 984 C1

RU 2 086 984 C1

Изобретение относится к биотехнологии, в частности, к клинической и ветеринарной микробиологии и иммунологии, и предназначено для экспрессной диагностики микробно-бактериальных у людей и животных.

Выявления кампилобактеров в пищевых продуктах, кормах и объектах внешней среды.

Известен способ получения диагностического для выявления термостабильных антигенов *Campylobacter jejuni* и *Campylobacter coli* с помощью коагулянтации.

предусматривающий получение сырьевых к животным культурам кампилобактеров, а также сырьевых сывороток (порядка 57), сенсибилизацию лиофилизированных клеток *S. aureus* Cowan 1, инкубирование в течение 1 ч при комнатной температуре, отбывание в ФЭС при центрифугировании и сублимацию в ФЭС, инкубирование 0,05 выходы натрия. Таким образом получают монодисперсионные, которые используют в РКА на этапе с жидкими и убийственными культурами исследуемых штаммов. Этот способ выбран в качестве ближайшего аналога. Однако известные диагностические придают только для серотипированных культур, метод серотипирования

многотипный и не пригоден для выявления антигена непосредственно в исследуемом материале. Коммерческие используют для выявления антигенов кампилобактеров реакции коагулянтации с известной нам литературе не имеют.

Техническим результатом достигнутым при использовании способа, является то, что полученный диагностический материал пригоден для выявления термостабильных антигенов кампилобактеров на только в культурах, но также непосредственно в исследуемом материале, что упрощает диагностику (РКА) ставит основатель и значительно сокращает время проведения анализа. Он достигается тем, что из набора часто встречающихся при патологии человека и животных сывороток кампилобактеров отбирают несколько культур, имеющих в своем составе максимальный спектр термостабильных антигенов, для иммунизации животных используют убиваемый сывороточный и протравленный при температуре 100 °С в течение 1 ч культуры, иммунизацию проводят мышь в возрасте 10-15 дней, выдерживая дозным от 1,0 до 16,0 млрд микр. кл. кампилобактеров с двумя повторными инъекциями после каждой инъекции крови, для сенсибилизации специфически используют смесь полученных сырьевых. Диагностический для выявления кампилобактеров реакции коагулянтации представляет собой комплекс, включающий емкость, заполненную диагностическим, вторую емкость с несенсибилизированным специализированным для отрицательного контроля и третью емкость для положительного контроля.

Известно, что наиболее распространенными сыворотками кампилобактеров по схеме Цог являются: L1, L2, L4, L5, L6, L7, L8, L11, K16, K17 и L36, которые составляют 70% выявленных культур. Наиболее распространенными штаммами, серотипированными по термостабильным антигенам 0 в CIA являются P1, P2, P4, P5, P3, P10, P15, P18, P21, P28, которые составляют 75,7% выявленных штаммов, у нас в стране L1, L5,

L6 L7. При этом культуры серотипов по схеме Цог часто сочетаются с наиболее распространенными 0-антигенами по схеме Рингел, так L1 часто сочетается с P2 (89) и L4 с P3 (11); серотип L36 с P2, P4 и P8 (19 L5 (15 соответствено); L1 с P4 и P7 (36 и 27 соответствено); L6 с P25, P17 и P7 (34 и 33 и 22 соответствено); L16 с P10 и P5 в 77 и 22 соответствено.

Исходя из этих данных, для дальнейшей разработки диагностического для РКА, исследования специфических периферно-реактивных антигенов, а также для получения антисывороток был использован набор культур кампилобактеров из 14 наиболее распространенных в патологии человека и животных сывороток кампилобактеров.

Пример 1. Получение сырьевых к каждому серотипу кампилобактеров (вакцинационный этап).

Для получения сырьевых были испытаны описанные в литературе, а также специально разработанные схемы иммунизации кроликов. Из 6 испытанных методов, в которых применялись формализированные, лучше при 100 °С культуры в течение 1 ч и 2 ч, ЛПС, полученные горячим фенольным методом по Вестфалу и Джен (1985), с адъювантом Фрейнда и без него, в равных дозах, мы остановились на оригинальном, разработанном нами методе получения антисыворотки к термостабильным антигенам, который заключается в следующем. Кроликов димитрием весом 2,5-3,0 кг иммунизировали убитой и высушенной выделенной микробной массой кампилобактеров после прогревания ее при 100 °С в течение 1 ч. Внутривенно, один раз в неделю в возрастающих дозах от 1,0 млрд микр. кл. до 16,0 млрд микр. кл. (I шприц); 4,0, 8,0 и 16,0 млрд микр. кл. (II шприц); 10,0 и 16,0 млрд микр. кл. (III шприц). После каждого курса вакцинации на 7-10 день брали кровь из ушной вены. Сырьевые использовали в реакции преципитации и иммуноэлектрофореза в геле с ЛПС каждого штамма и периферно.

Пример 2. Подготовительный этап-отбор штаммов для получения диагностического кампилобактериального для реакции коагулянтации.

Методом иммуноэлектрофореза в геле и преципитации в геле было установлено, что многие сыворотки к изученным культурам кампилобактеров (10 из 15) имеют в своем составе, кроме антигенов к гомологичным термостабильным антигенам 0 этих бактерий, также антигены к гетерогенным 0-антигенам других серотипов, причем некоторые сыворотки имеют антигены к двум или даже шести термостабильным 0-антигенам.

На основании этих данных в смесь сырьевых для приготовления кампилобактериального диагностического включили следующие культуры кампилобактеров. Так, из тип. I видно, что сырьевые к антигенам штамма 5 и наборов, сырьевых к штамму 8 являются моноспецифическими; сырьевые к штамму 35 вызывают антиген также штамма 21 и ряда гомологичных

RU 2 086 984 C1

RU 2 086 984 C1

RU 2 0 8 6 9 8 4 C 1

RU 2 0 8 6 9 8 4 C 1

активности; сыворотка к штамму 24 имеет антитела к термостабильным антигенам сероваров 1, 2, 8, 20, 21, 25. Таким образом для смеси можно было взять эти 4 сыворотки. Данный пример не ограничивает границ изобретения.

Пример 3. Получение кампилобактериозного диагностикума (исонный этап).

Для получения сывороток, которые содержат бы антигена ко всем термостабильным антигенам наиболее часто встречающихся серотипов кампилобактеров, берут штаммы кампилобактеров, имеющие максимальный набор термостабильных антигенов этих серотипов, выращивают на твердой питательной среде, смывают физиологическим раствором (0,9 хлорида натрия), взвесь микробов заливают тремя объемами ацетона, через сутки дважды отфильтровывают порциями, высушивают высушивают микробы на воздухе. Убитые и высушенные микробы каждого штамма растворяют 0,9-ным раствором хлорида натрия до концентрации 20-25 млрд микр. кл. проливают в водной бане при 100 °C в течение 1 ч и хранят при 2-6 °C в течение всего периода иммунизации. Кролика иммунизируют, как указано в примере 1. Определают рабочие разведения на основе поглотительной реакции сыворотки, необходимое для приготовления смеси, путем приготовления пробных диагностикумов для РГА и испытаний их в серологическом РЛС. Добавляют смесь этих сывороток, используя также их соотношения, чтобы в смеси содержалось примерно равное количество антител к разным термостабильным антигенам, учитывая их разведения при изготовлении пробных диагностикумов, например, если рабочие разведения первой, второй и третьей сывороток соответственно составили 1:200, 1:400 и 1:400, то для приготовления смеси этих сывороток берут их соотношения как 2:1:1 (табл.1).

Для приготовления полноразмерного диагностикума берут 0,1 мл смеси сывороток, добавляют 0,9 мл 10-ной взвеси стабилизированной формалином (0,5 раствор формальдегида 2 ч) и прогревают (65 °C 2 ч), отфильтровывают при центрифугировании Сомакс 1, тщательно перемешивают и доводят ФСБ до 10 мл. Приготовленный таким образом кампилобактериозный диагностикум контролируют путем постановки РГА на стеклах с ЛПС или протыми (100 °C 1 ч) культурами наиболее часто встречающихся серотипов *Salmonella* *Jerini*, *coi*, *infia*, *adys* и в реакциях разведения. Для определения чувствительности, а также других интервалов для определения специфичности проверяют. Для постановки РГА одну каплю каждого разведения ЛПС (диагностикума, от 10⁻¹ до 10⁻⁴ мл/мл) наносят на предметное стекло, разделение на секторе стеклораствора, и добавляют к ней одну каплю сенсифицированной от стабилизатора (диагностикума) в контроле N 1 высушенного диагностикума. Помещают каплю несенсибилизированного стафилококка (отрицательный контроль), в контроле N 2 - к диагностикуму добавляют ЛПС *Salmonella*, разведенный в ФСБ (положительный контроль). Капли осторожно перемешивают

повышением стекла в течение 3-5 мин, помещают во влажную камеру на 30 мин. Учет реакции проводят по 4-кратной шкале, положительный считается агглютинация стафилококка на 2+.

Набор диагностикума для выявления термостабильных антигенов кампилобактеров включает: 1, емкость (выпуклая, плоская), заполненную диагностикумом в объеме 1-2 мл; 2, емкость, заполненную несенсибилизированным 1 стафилококком для отрицательного контроля 1-2 мл; 3, емкость, заполненную жидкостью для положительного контроля 1-2 мл.

Приготовленный кампилобактериозный диагностикум должен давать положительную реакцию коагулирования со всеми наиболее распространенными культурами кампилобактеров разных серотипов или их антигенами при концентрации порядка 100 мкг/мл и более. Он не должен реагировать с антигенами других видов бактерий (табл. 2).

Пример 4. Использование кампилобактериозного диагностикума для выявления термостабильных антигенов этих бактерий непосредственно в исследуемом материале.

Для определения термостабильных антигенов кампилобактеров материал (копроэкстракт, слюна, моча, сыворотка крови, пищевые продукты, корма) протравляют в водной бане при 100 °C в течение 30 мин, оседают центрифугированием или фильтрацией. Одну каплю исследуемого материала наносят на предметное стекло, размешивают на секторе извращения по стеклу, добавляют одну каплю диагностикума, осторожно перемешивают повышением стекла в течение 3-5 мин, оставляют во влажной камере на 30 мин при комнатной температуре. Учет реакции проводят визуально, отмечая интенсивность реакции над выпуклостью аэриалом микроскопа. Положительный считается реакция на 2+. Контролем служат капли исследуемого материала с несенсибилизированным стафилококком (отрицательный контроль). Положительным контролем является реакция агглютинации диагностикума с ЛПС кампилобактеров, прилегающего к набору. Разработанный диагностикум был применен на материале от здоровых и больных людей, а также при исследовании птиц, или содержащих высушенника, печенку кур, в таком материале от rabbits птиц семейства (табл. 3).

Показано достаточно высокая чувствительность разработанного кампилобактериозного диагностикума в выявлении антигенов этих бактерий; наши данные соответствуют результатам других исследователей, показавших высокую частоту выявления кампилобактеров у людей и животных с помощью бактериологического метода.

Применение диагностикума, полученного по предельному способу, позволяет проводить экспресс-диагностику кампилобактериозов у больных людей и животных, выявлять инфицирование кампилобактерами пищевых продуктов, кормов и сыпавтов внешней среды, сформированно в исследуемом материале без проведения бактериологического

исследования и выделения чистой культуры, требующих специальных дорогостоящих питательных сред и оборудования. Постановка РКА с помощью предлагаемого диагностикума является техникой простой процедурой, а способ приготовления диагностикума и его применения, в особенности при массовых исследованиях, экономически значительно более эффективен, чем другие способы диагностики кампилобактериоза.

Формула изобретения:

1. Способ получения диагностикума для выявления термостабильных антигенов кампилобактеров, включающий реакцию иммунизации животных культурами *Salmonella* spp. разных серотипов с последующим забором крови от каждого животного, выделением сывороток,

сенсibilизацией полученными сыворотками клетки *Shigetoosoccus aureus* Cowan I, отмытой, ресуспендированием и концентрированием, отличающийся тем, что животных иммунизируют дезактивированной нагреванием и высушенной эфиром микробной массой кампилобактеров внутривенно дозами 1,0-15,0 млрд клеток, а полученным от разных животных сывороткам перед сенсibilизацией смешивают.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что дезактивацию кампилобактеров проводят при температуре 100°C в течение 1 ч.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для приготовления смеси берут ограниченное (3-5) число сывороток, имеющих максимальный набор антиген к термостабильным антигенам кампилобактеров разных серотипов.

RU 2086984 C1

RU 2086984 C1

Таблица 1

Антигенные связи *Campylobacter jejuni*, *coli*, *laridis* по данным реакции преципитации и иммуноэлектрофореза в агаре

ЛПС штаммов		Сыворотки сывороток <i>Campylobacter</i>															
		1	2	4	5	6	7	11	18	36	8	20	21	31	36	73	
		jejuni									coli laridis						
<i>C. jejuni</i>	1	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	
	4	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	7	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	-	-	-	-	
	11	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	18	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
36	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-		
<i>C. coli</i>	8	-	-	-	-	-	+	-	-	++	++	+	-	-	-	-	
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	++	-	-	-	
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	
<i>C. laridis</i>	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++	-	-	
	73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	

RU 2086984 C1

RU 2086984 C1

Таблица 2

Специфичность поливалентного кампилобактерного диагностикума
в реакции коагглютинации

Вид бактерий, серovar	Исследуемый материал	Результаты РКА
<i>Campylobacter jejuni</i> L1	ЛПС музейный штамм /ЦНИИЗ/	+
то же L2	то же	+
- " - L4	- " -	+
- " - L5	- " -	+
- " - L6	- " -	+
- " - L7	- " -	+
- " - L11	- " -	+
- " - L18	- " -	+
- " - L36	- " -	+
<i>Campylobacter coli</i> L6	ЛПС музейный штамм /ЦНИИЗ/	+
то же L20	- " -	+
- " - L21	- " -	+
<i>Campylobacter lariidis</i> L36	ЛПС музейный штамм /ЦНИИЗ/	+
то же L73	- " -	+
<i>Campylobacter coli</i> 36	культура, выделения от человека музейный штамм (НИИЭМ им. Габричевского)	+
то же 315	то же	+
- " - 15	культура от больного человека	+
<i>Campylobacter cesaris</i>	культура от здорового человека	+
<i>Campylobacter jejuni</i> 265	музейный штамм	+
то же 31	культура от больной курицы	+
- " - K-2	культура от больного человека	+
- " - 35	культура от больной обезьяны	+
<i>Y.pseudotuberculosis</i> I	эталонный штамм /Швеция/	-
то же II	то же	-
- " - III	- " -	-
<i>Y enterocolitica</i> 03	эталонный штамм /НИИЭМ им. Пастера/	-
то же 06	эталонный штамм	-
- " - 07,8	то же	-
- " - 05	- " -	-
<i>Shigella sonnei</i> 476	эталонный штамм /НИИЭМ им. Гамалеи/	-
flexneri 616M	музейный штамм	-
newcastle 1221	то же	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	музейный штамм	-
choleraesuis	то же	-
muenchen	- " -	-
mission	- " -	-

RU 2086984 C1

RU 2086984 C1

Таблица 3

Определение термостабильных антигенов *Camptylobacter jejuni*, *coli*, *laridis* с помощью поливалентного диагностикума реакцией коагглютинации.

Объект исследования	Материал	Число проб	Частота выявления О-антигенов, %:	
			<i>Camptylobacter</i>	<i>Salmonella</i>
Население разных регионов страны	ЦИК сыворотки крови	1197	0 - 10 ср. $3,76 \pm 0,56$	$8,9 \pm 0,8$
Больные люди:	копрофильтрат, слюна,	806	$6,7 \pm 2,3$ $14,4 \pm 5,5$ до $21 \pm 1,7$	$65,7 - 91,7$ $24,6 \pm 6,3$
Сальмонеллез	моча, кровь			
ОКИНЗ		97		
Куры	Смывы с тушек, яйца, печень, кишечник, корма	499	6 - 38	2 - 59
Обслуживающий персонал птицефабрик	Кoproфильтраты, кровь, ЦИК	210	13,5 - 29	26

RU 2 0 8 6 9 8 4 C 1

RU 2 0 8 6 9 8 4 C 1